



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-179394

出 願 人

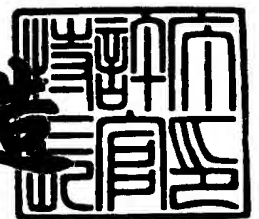
Applicant(s):

東ソー株式会社

2001年 5月30日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3047332

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA211-0199

【提出日】 平成12年 6月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 15/00

【発明の名称】 メシチリン耐性黄色ブドウ球菌の m e c A 遺伝子の検出
法

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 1 7 1 8 - 1 2

 【氏名】 田谷 敏貴

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区岸根町 4 9 0 - 1 7

 【氏名】 石黒 敬彦

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県大和市桜森 2 - 2 0 - 1 6 - 1 0 1

 【氏名】 斉藤 寿一

【特許出願人】

 【識別番号】 000003300

 【氏名又は名称】 東ソー株式会社

 【代表者】 田代 圓

 【電話番号】 (03)-3505-4471

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 003610

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

特 2 0 0 0 - 1 7 9 3 9 4

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】メシチリン耐性黄色ブドウ球菌の *mecA* 遺伝子の検出法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中に存在するメシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin-Resistant Staphyrococcus Aureus*、以下 *MRSA*) の遺伝子要素である *mecA* 遺伝子に由来する RNA の特定配列を鋳型として、該特定配列に相同的な配列を有する第一のプライマーおよび該特定配列に相補的な配列を有する第二のプライマー（ここで第一または第二のプライマーのいずれか一方のプライマーは、5' 側に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加した配列を有する）を用い、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより cDNA を生成することにより RNA-DNA 2 本鎖を形成し、リボヌクレオース H により RNA-DNA 2 本鎖の RNA を分解して 1 本鎖 DNA を生成し、該 1 本鎖 DNA を鋳型として DNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより前記 RNA 配列または前記 RNA 配列に相補的な配列からなる RNA を転写可能なプロモーター配列を有する 2 本鎖 DNA を生成し、そして該 2 本鎖 DNA が RNA ポリメラーゼ存在下で RNA 転写産物を生成し、該 RNA 転写産物が引き続き前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼによる 1 本鎖 DNA 生成の鋳型となるような RNA 増幅工程を利用した検出法において、第一のプライマーとして配列番号 1 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 2 から 4 のいずれかのオリゴヌクレオチドを用いるか、第一のプライマーとして配列番号 5 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 6 または 7 のオリゴヌクレオチドを用いるか、または第一のプライマーとして配列番号 8 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 6 または 7 のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、検出法。

【請求項 2】 前記第一のプライマーが配列番号 1、5 または 8 の配列のうち少なくとも連続した 10 塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 1 の検出法。

【請求項 3】 前記第二のプライマーが配列番号 2、3、4、6 または 7 の配列のうち少なくとも連続した 10 塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであること

を特徴とする、請求項 1 の検出法。

【請求項 4】 請求項第 1 項に記載された RNA 増幅工程を、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施することからなり、ここで該プローブの配列が RNA 転写産物の少なくとも一部と相補的であり、該プローブが RNA 転写産物と相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものである、反応液の蛍光強度を測定することからなるメシチリン耐性黄色ブドウ球菌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査におけるメシチリン耐性黄色ブドウ球菌の検出法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

MRSA は、ブドウ球菌が産生する β -ラクタマーゼに安定とされるメチシリンなどの β -ラクタマーゼ耐性ペニシリン剤に耐性を示す黄色ブドウ球菌の耐性株を意味する。院内感染の主要な病原菌であり、治療薬の切り札的存在とみなされているバンコマイシンに軽度耐性を示す菌株も検出されている。このように、MRSA は決定的な抗菌薬がないために大きな医療問題となっている。従って、臨床検査における正確・迅速な検出は、診断と治療における重大な課題である。

【0003】

通常、黄色ブドウ球菌が産生する細胞壁合成タンパク質 PBP (penicillin-Binding Protein) は PBP-1 から PBP-4 の 4 種類存在するが、MRSA では PBP-2' と名付けられた新たな PBP も産生される。この PBP は β -ラクタム系の抗生物質への結合親和力の弱い特異的なタンパク質であり、耐性の中心的な役割を果たすことが知られている。PBP-2' をコードする遺伝子 *mecA* の配列は既に知られている (FEBS Lett. 221, 167~171, 1987 年、他)。そこで、MRSA の検出および同定には、*mecA* 遺伝子に特異的な遺伝子プローブを用いるハイブリダイゼ

ーション法が試みられている

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、MRSAを遺伝子レベルで検出する試みがなされているが、試料の調製に患者検体から採取した菌の培養が必要なため、迅速性に問題があった。MRSAの検出および同定には、培養に長時間を要し、また短時間で試料中に存在する極微量のmecA遺伝子を検出することは困難であったため、臨床診断の分野では迅速かつ高感度な検出法の出現が望まれている。さらには、検査をより簡便にするために、自動検査装置の開発も望まれている。

【 0 0 0 5 】

検出を高感度で行うためには、検出および同定しようとする遺伝子や該遺伝子に由来するRNA（以下これらを標的核酸とする）中の特定の配列を増幅したうえで検出等することが好適である。

【 0 0 0 6 】

標的核酸がDNAである場合の増幅法としては、ポリメレースチェインリアクション（PCR）法が知られている。この方法は、標的DNA中の特定の配列の両末端部に相補的および相同な一組のプライマーと熱耐性DNAポリメレース存在下で、熱変性、プライマー・アニール、伸長反応からなるサイクルを繰り返し行うことによって前記特定の配列を増幅する方法である。この時、前記特定の配列をPCR法で増幅するには前記特定の配列との特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要であり、更にその検出及び同定を高感度で行うためには、標的DNAとの特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要である。更にはそれらのオリゴヌクレオチドの最適な組み合わせを検討する必要がある。そこで、特定の配列のオリゴヌクレオチドを用いて、mecA遺伝子をPCR法で黄色ブドウ球菌の染色体DNA上に検出する試みがなされている。しかしながら、試料の調製に患者検体から採取した菌の培養が必要なため、前記のハイブリダイゼーション法と同様、迅速性に問題があった。また、染色体DNA上のmecA遺伝子を検出したとしても、実際にPBP-2'の発現を同定したことにはならないために、臨床的意義上の問題点も挙げられる。また、PCR法は急激な昇温・降温を繰り返すという

複雑操作が必要であり、そのことが自動化への障害となる。

【0007】

一方、標的核酸がRNAである場合の増幅法としては、RT-PCR法その他、逆転写酵素およびRNAポリメラーズの協奏的作用によって前記特定配列を増幅するNASBA法や3SR法等が知られている。この方法は、標的RNAの特定配列に対し、プロモーター配列を含むプライマーと逆転写酵素、およびリボヌクレースHにより、プロモーター配列を含む2本鎖DNAを合成し、該2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーズにより、前記特定配列を含むRNAを合成するとともに、該RNAが引き続きプロモーター配列を含む2本鎖DNA合成の鋳型となる連鎖反応を行うものである。NASBA法や3SR法は一定温度での核酸増幅が可能であり、自動化へ適している方法だと考えられる。しかし、これらの増幅法は比較的低温（例えば41℃）で反応を行うために、標的RNAが分子内構造を形成し、プライマーの結合を阻害し、反応効率を低下させる可能性が考えられる。したがって、増幅反応の前に標的RNAの熱変性を行うことで、標的RNAの分子内構造を壊し、プライマーの結合効率を向上させるための操作が必要であった。

【0008】

そこで本願発明は、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌が産生する細胞壁合成タンパク質PBP-2'をコードするmecA遺伝子に由来するRNAを比較的低温（例えば41℃）で特異的に増幅したり、検出および同定を高感度で行うために有用なオリゴヌクレオチドの好適な組み合わせの提供を目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するためになされた本願請求項1の発明は、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子に由来するRNAの特定配列を鋳型として、該特定配列に相同的な配列を有する第一のプライマーおよび該特定配列に相補的な配列を有する第二のプライマー（ここで第一または第二のプライマーのいずれか一方のプライマーは、5'側にRNAポリメラーズのプロモーター配列を付加した配列を有する）を用い、RNA依存性DNAポリメラーズによりcDNAを生成

することによりRNA-DNA 2本鎖を形成し、リボヌクレエースHによりRNA-DNA 2本鎖のRNAを分解して1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼにより前記RNA配列または前記RNA配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、そして該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによる1本鎖DNA生成の鋳型となるようなRNA増幅工程を利用した検出法において、第一のプライマーとして配列番号1のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号2から4のいずれかのオリゴヌクレオチドを用いるか、第一のプライマーとして配列番号5のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号6または7のオリゴヌクレオチドを用いるか、または第一のプライマーとして配列番号8のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号6または7のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする。

【0010】

本願請求項2の発明は、請求項1の発明に係り、前記第一のプライマーが配列番号1、5または8の配列のうち少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする。本願請求項3の発明は、請求項1の発明に係り、前記第二のプライマーが配列番号2、3、4、6または7の配列のうち少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする。そして本願請求項4の発明は、請求項1の発明に係り、前記RNA増幅工程を、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で実施することからなり、ここで該プローブの配列がRNA転写産物の少なくとも一部と相補的であり、該プローブがRNA転写産物と相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものである、反応液の蛍光強度を測定することからなるメシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子の検出方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本願発明は、比較的低温かつ一定温度（35℃～50℃、好ましくは41℃）で、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子に由来するRNAを増幅お

よび検出するためのオリゴヌクレオチドの組合せを提供すること、すなわち *mecA* 遺伝子に由来する RNA の増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー、及び検出用のオリゴヌクレオチドプローブの組合わせを提供することで、それを利用した簡便、迅速かつ高感度な *mecA* 遺伝子の検出方法ならびに検出キットを臨床検査等に提供するものである。

【 0 0 1 2 】

本願発明の態様の一例では、試料中に存在するメシチリン耐性黄色ブドウ球菌の *mecA* 遺伝子に由来する RNA の特定配列を鋳型として、第二のプライマー（標的 RNA の特定配列の 3' 末端領域に相補的配列）が相補結合し、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼによる伸長反応から cDNA を生成することにより RNA-DNA からなる 2 本鎖を形成し、次いでリボヌクレース H により RNA-DNA 2 本鎖の RNA を分解して 1 本鎖 DNA を生成する。その後、該 1 本鎖 DNA に対し第一のプライマー（標的 RNA の 5' 末端領域に相同的配列であり、5' 末端に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列が付加されている）が相補結合し、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより前記標的 RNA 配列と相同的な配列からなる RNA を転写可能なプロモーターを有する 2 本鎖 DNA を生成する。そして、該 2 本鎖 DNA が RNA ポリメラーゼ存在下で前記標的 RNA と相同的な配列からなる RNA 転写産物が増幅される。そして本願発明は、第一のプライマーとして配列番号 1、5 または 8 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 2、3、4、6 または 7 の配列のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする。第一および第二のプライマーは、それぞれの配列番号の全長であっても良いが、各配列の中の少なくとも連続した 10 塩基以上からなるオリゴヌクレオチドの組み合わせを使用することもできる。

【 0 0 1 3 】

上記本願発明の一態様において、標的 RNA は、特定配列の 5' 末端で切断される必要がある。このように標的 RNA を切断する方法としては、特定配列の 5' 末端に重複して隣接する領域に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド（切断用オリゴヌクレオチドプローブ）を添加することによって、標的 RNA をリボヌクレース H 等により切断する方法が好ましい。該切断用オリゴヌクレ

オチドの3'末端はオリゴヌクレオチドプライマーとして機能しないように処理されたもの、例えばアミノ化等されているものを使用することが望ましい。

【0014】

上記本願発明の一態様においては増幅されるRNA転写産物の配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するインターカラー性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（検出用オリゴヌクレオチドプローブ）存在下でこの増幅工程を実施することが好ましい。この際、該プローブがRNA転写産物と相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであって、反応液の蛍光強度を測定すれば良い。さらには、標識されたオリゴヌクレオチドプローブを増幅工程中に共存させる場合には、プローブが伸長反応のプライマーとして機能しないように、例えばその3'末端にグリコール酸を付加する等の修飾を行うことが特に望ましい。検出用オリゴヌクレオチドプローブとしては、配列番号3または12に記載した配列のオリゴヌクレオチドを利用することが例示できる。

【0015】

また本願発明の別の態様では、試料中に存在するメシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子に由来するRNAの特定配列を鋳型として、第二のプライマー（標的RNAに相補的配列で、5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列が付加されている）が相補結合し、RNA依存性DNAポリメラーゼによる伸長反応からcDNAを生成することによりRNA-DNAからなる2本鎖を形成し、次いでリボヌクレースHによりRNA-DNA 2本鎖のRNAを分解して1本鎖DNAを生成する。その後、該1本鎖DNAに対し第一のプライマー（標的RNAの5'末端領域に相補的配列であり、）が相補結合し、DNA依存性DNAポリメラーゼにより前記標的RNA配列と相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーターを有する2本鎖DNAを生成する。そして、該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下で前記標的RNAと相補的な配列からなるRNA転写産物が増幅される。そして本願発明は、第一のプライマーとして配列番号1、5または8のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号2、3、4、6または7の配列のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする。第一お

よび第二のプライマーは、それぞれの配列番号の全長であっても良いが、各配列の中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドの組み合わせを使用することもできる。

【0016】

上記本願発明の一態様においては増幅されるRNA転写産物の配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（検出用オリゴヌクレオチドプローブ）存在下でこの増幅工程を実施することが好ましい。この際、該プローブがRNA転写産物と相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであって、反応液の蛍光強度を測定すれば良い。さらには、標識されたオリゴヌクレオチドプローブを増幅工程中に共存させる場合には、プローブが伸長反応のプライマーとして機能しないように、例えばその3'末端にグリコール酸を付加する等の修飾を行うことが特に望ましい。検出用オリゴヌクレオチドプローブとしては、配列番号3または12に記載した配列と相補的な配列のオリゴヌクレオチドを利用することが例示できる。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本願発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0018】

実施例1

本願発明によるオリゴヌクレオチドプライマーの組合わせを用いて、標的RNAの特異的増幅を行った。なおmecA-RNAとは、mecAの塩基配列を含む2本鎖DNAを鋳型としたインビトロ転写により合成、精製されたRNAである。

【0019】

(1) PBP-2' に由来するmecA-RNAの塩基番号1~2013 (RNAの塩基番号は松橋ら「FEBS Lett. 221, 167~171 (1987)」に従った) を含む標準RNA (2016mer) を試料とし、260nm

の紫外吸収により定量後、RNA希釈液（10mM Tris-HCl（pH8.0）、0.1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor、5.0mM DTT）を用い 1.0×10^4 コピー/ 2.5μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区（Neg a）には希釈液のみを用いた。

【0020】

（2）以下の組成の反応液 23.3μ lを0.5ml容PCR用チューブ（Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製）に分注し、これに上記RNA試料 2.5μ lを添加した。

【0021】

反応液の組成（濃度は酵素溶液添加後の反応系の最終濃度）

60.0mM Tris-塩酸緩衝液（pH8.6）

13.0mM 塩化マグネシウム

90.0mM 塩化カリウム

1.0mM DTT

各0.25mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各3.0mM ATP、CTP、UTP

2.25mM GTP

3.6mM ITP

各 1.0μ Mの第一のプライマーと第二のプライマー

0.16μ Mの切断用オリゴヌクレオチドプローブ（標的RNAを第一のプライマーが結合し得る位置で切断するためのオリゴヌクレオチド、3'末端はアミノ化してある）

39U リボヌクレエース インヒビター（宝酒造（株）製）

15.0% DMSO

容量調製用蒸留水

なお、第一のプライマー、第二のプライマーおよび切断用プローブの組み合わせとしては、以下の番号のうち、いずれか一つを用いた。

【0022】

1. 第一のプライマーとして配列番号1として記載した配列の5'末端4番目

から 1 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、その 5' 末端には、配列番号 1 3 で示した T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 2 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

2. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 1 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 3 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

3. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 1 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 4 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

4. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 2 8 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 3 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

5. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 2 8 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 4 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

6. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 1 番目から 2 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 3 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

7. 第一のプライマーとして配列番号 1 として記載した配列の 5' 末端 1 番目から 2 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 4 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 9 に記載したオリゴヌクレオチド

8. 第一のプライマーとして配列番号 5 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 2 8 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 6 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 1 0 に記載したオリゴヌクレオチド

9. 第一のプライマーとして配列番号 5 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 2 8 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 7 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 1 0 に記載したオリゴヌクレオチド

1 0. 第一のプライマーとして配列番号 5 として記載した配列の 5' 末端 1 番目から 2 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 6 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 1 0 に記載したオリゴヌクレオチド

1 1. 第一のプライマーとして配列番号 5 として記載した配列の 5' 末端 1 番目から 2 5 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 7 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 1 0 に記載したオリゴヌクレオチド

1 2. 第一のプライマーとして配列番号 8 として記載した配列の 5' 末端 4 番目から 2 8 番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5' 末端には配列番号 1 3 の T 7 ポリメレースのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号 6 に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号 1 1 に

記載したオリゴヌクレオチド

13. 第一のプライマーとして配列番号8として記載した配列の5'末端4番目から28番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5'末端には配列番号13のT7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号7に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号11に記載したオリゴヌクレオチド

14. 第一のプライマーとして配列番号8として記載した配列の5'末端1番目から25番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5'末端には配列番号13のT7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号6に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号11に記載したオリゴヌクレオチド

15. 第一のプライマーとして配列番号8として記載した配列の5'末端1番目から25番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5'末端には配列番号13のT7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号7に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号11に記載したオリゴヌクレオチド

(3) 上記の反応液を、41℃で5分間保温後、以下の組成の予め41℃で2分間保温した酵素液4.2μlを添加した。

【0023】

酵素液の組成（反応時の再終濃度）

1. 7% ソルビトール

8ユニット AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

142ユニット T7 RNAポリメラーゼ（GIBCO社製）

3μg 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを41℃に90分間保温した後、特定の増幅産物を4%アガロースゲルを用いた電気泳動により分析した。

【0024】

(5) 電気泳動後の染色には市販の染色液（商品名；SYBR Green I

I、宝酒造（株）製を用いた。

【0025】

電気泳動結果を図1（白黒反転した写真）に示した。いずれの組み合わせにおいても、mecA-RNAを添加した系において、特異的なRNA増幅産物（矢印部分）が得られた。このことから、これらのオリゴヌクレオチドプライマーの組合せは、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子に由来するRNAの増幅、検出に有用であることが示された。

【0026】

実施例2

本願発明によるオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて、標的RNAであるmecA-RNAの特異的な検出が可能であることを確認した。

【0027】

(1) PBP-2' に由来するmecA-RNAの塩基番号1~2013（RNAの塩基番号は松橋ら「FEBS Lett. 221, 167~171 (1987)」に従った）を含む標準RNA（2016mer）を試料とし、260nmの紫外吸収により定量後、RNA希釈液（10mM Tris-HCl（pH8.0）、0.1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor、5.0mM DTT）を用い 1.0×10^6 コピー/ 2.5μ lまたは 1.0×10^4 コピー/ 2.5μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区（Neg a）には希釈液のみを用いた。

【0028】

(2) 以下の組成の反応液23.3 μ lを0.5ml容PCR用チューブ（Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製）に分注し、これに上記RNA試料2.5 μ l（mecA-RNA）を添加した。

【0029】

反応液の組成（濃度は酵素溶液添加後の反応系の最終濃度）

60.0mM Tris-塩酸緩衝液（pH8.6）

13.0mM 塩化マグネシウム

90.0 mM 塩化カリウム

1.0 mM DTT

各0.25 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各3.0 mM ATP、CTP、UTP

2.25 mM GTP

3.6 mM ITP

1.0 μ Mの第一のオリゴヌクレオチドプライマー

1.0 μ Mの第二のオリゴヌクレオチドプライマー

0.16 μ Mの切断用オリゴヌクレオチドプローブ（標的RNAを第一のプライマーが結合し得る位置で切断するためのオリゴヌクレオチド、3'末端はアミノ化してある）

25.0 nMのインターカラー性蛍光色素（図2）で標識された検出用オリゴヌクレオチドプローブ（MRSH-YO、3'末端はグリコール酸で修飾してある）。

【0030】

39 U リボヌクレエース インヒビター（宝酒造（株）製）

15.0% DMSO

容量調製用蒸留水

なお、プライマー・プローブの組み合わせとしては、以下の番号のうち、いずれか一つを用いた。

【0031】

1. 第一のプライマーとして配列番号1として記載した配列の5'末端4番目から15番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、その5'末端には配列番号13に示したT7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した）、第二のプライマーとして配列番号2に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号9に記載したオリゴヌクレオチド配列、検出用プローブとして配列番号3に記載したオリゴヌクレオチド配列

2. 第一のプライマーとして配列番号8として記載した配列の5'末端1番目から25番目までのオリゴヌクレオチド（ただし、5'末端には配列番号13の

T7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した)、第二のプライマーとして配列番号7に記載したオリゴヌクレオチド、切断用プローブとして配列番号11に記載したオリゴヌクレオチド配列、検出用プローブとして配列番号12に記載したオリゴヌクレオチド配列

(3) 上記の反応液を、41℃で5分間保温後、以下の組成で、かつ、予め41℃で2分間保温した酵素液4.2μlを添加した。

【0032】

酵素液の組成(反応時の再終濃度)

1. 7% ソルビトール

8ユニット AMV逆転写酵素 (宝酒造(株)製)

142ユニット T7 RNAポリメラーゼ (GIBCO社製)

3μg 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付き蛍光分光光度計を用い、41℃保温して、励起波長470nm、蛍光波長510nmで、反応溶液の蛍光強度を経時的に測定した。酵素添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比(所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値)の経時変化を図3に示した。RNAサンプル濃度は組み合わせ1では 10^6 コピー/30μl、組み合わせ2では 10^4 コピー/30μlである。

【0033】

標的RNAにmecA-RNAを添加した系では、特異的な蛍光増感が得られた。以上のことから、本願発明のオリゴヌクレオチドの組み合わせはmecA遺伝子由来のRNAを特異的に増幅検出することが可能であることが示された。

【0034】

実施例3

本願発明によるオリゴヌクレオチドプライマーの組合わせを用いて、標的RNAの様々な初期コピー数における検出を行った。

【0035】

(1) PBP-2' に由来するmecA-RNAの塩基番号1~2013 (RN

Aの塩基番号は松橋ら「FEBS Lett. 221, 167~171 (1987)」に従った)を含む標準RNA (2016mer)を試料とし、260nmの紫外吸収により定量後、RNA希釈液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor、5.0mM DTT)を用い 1.0×10^4 コピー/ 2.5μ lから10コピー/ 2.5μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区 (Neg a)には希釈液のみを用いた。

【0036】

(2) 以下の組成の反応液 23.3μ lを0.5ml容PCR用チューブ (Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製)に分注し、これに上記RNA試料 2.5μ l (mecA-RNA)を添加した。

【0037】

反応液の組成 (濃度は酵素溶液添加後の反応系の最終濃度)

60.0mM Tris-塩酸緩衝液 (pH8.6)

13.0mM 塩化マグネシウム

90.0mM 塩化カリウム

1.0mM DTT

各0.25mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各3.0mM ATP、CTP、UTP

2.25mM GTP

3.6mM ITP

1.0 μ Mの第一のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号8として記載した配列の5'末端4番目から28番目までのオリゴヌクレオチド。ただし、5'末端には配列番号13のT7ポリメラーゼのプロモータ配列を付加した)

1.0 μ Mの第二のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号6に記載した配列の5'末端1番目から18番目までのオリゴヌクレオチド)

0.16 μ Mの切断用オリゴヌクレオチドプローブ (配列番号11、標的RNAを第一のプライマーが結合し得る位置で切断するためのオリゴヌクレオチド)

、3'末端はアミノ化してある)

25.0 nMのインターカラー性蛍光色素(図2)で標識された検出用オリゴヌクレオチドプローブ(MRSA-YO)、そのオリゴヌクレオチド配列は配列番号12であり、3'末端はグリコール酸で修飾してある)

39U リボヌクレエース インヒビター(宝酒造(株)製)

15.0% DMSO

容量調製用蒸留水

(3) 上記の反応液を、41℃で4分間保温後、以下の組成で、かつ、予め41℃で2分間保温した酵素液4.2 μlを添加した。

【0038】

酵素液の組成(反応時の再終濃度)

1.7% ソルビトール

8ユニット AMV逆転写酵素(宝酒造(株)製)

142ユニット T7 RNAポリメラーゼ(GIBCO社製)

3 μg 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付き蛍光分光光度計を用い、41℃保温して、励起波長470 nm、蛍光波長510 nmで、反応溶液の蛍光強度を経時的に測定した。酵素添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比(所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値)の経時変化を図4に示した。RNAサンプル濃度は10コピー/30 μlから10⁴コピー/30 μlである。

【0039】

図4より、標的RNAの初期濃度に依存した蛍光プロファイルが得られ、未知試料中に存在するmecA遺伝子に由来するRNA量を推測することが可能であることが示唆された。

【0040】

【発明の効果】

以上の説明のように、本発明によれば、試料中のRNAが分子内構造を形成し

、プライマーやプローブの結合を阻害しかねない、比較的低温かつ一定温度（35～50℃、好ましくは41℃）条件下でも、PBP-2' をコードするmecA遺伝子に由来するRNAに特異的に結合し、標的RNAを迅速に増幅し、かつ検出等するためのオリゴヌクレオチドプライマー、オリゴヌクレオチドプローブの組み合わせとして有用である。

【0041】

上記以外にも、本願発明のオリゴヌクレオチドの組み合わせは、mecA-RNAに限らず、RNAを逆転写して得られるcDNAを検出するためには、上記したオリゴヌクレオチドと相補的配列も有用である。

【0042】

本願発明の組み合わせにおけるオリゴヌクレオチドの塩基長は、具体的に記載した長さに限られず、これら配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドを含む。これは、比較的低温（好ましくは41℃）条件下で、プライマーまたはプローブの標的核酸への特異性を確保するためには10mer程度の塩基配列があれば十分であることから、明らかである。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOSOH Corporation

<120> メシチリン耐性黄色ブドウ球菌のmecA遺伝子の検出法

<130> PA211-0199

<160> 13

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 1

aaattgggta caagatgata ccttcggt

28

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 2

gaaggtgtgc ttac

14

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 3

ttttcttttt ctctattaat g

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>プライマー

<400> 4

gttagttgaa tatctttgcc

20

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>プライマー

<400> 5

aaagaaaaaa gatggcaaag atattcaa

28

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 6

ttcttttttta tcttcggtta

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 7

tcattgctgt taatattttt

20

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 8

caactaacta ttgatgctaa agttcaaa

28

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プローブ

<400> 9

cccaattttg atccatttgt tgttgatata gtcttcaga

39

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プローブ

<400>10

ttttcttttt ctctattaat gtatgtgcga ttgtattgc

39

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プローブ

<400> 11

gttagttgaa tatctttgcc atcttttttc ttttctct

39

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー

<400> 12

tgtttgaggg tggatagcag

20

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> T7 phage

<220>

<221> promoter

<223> T 7 ポリメラーゼのプロモータ配列

<400> 13

aattctaata cgactcacta tagggaga

28

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、実施例 1 において、RNA 増幅反応を様々なプライマーの組み合わせ

により行った結果である。図中、Pは初期RNA量 10^5 コピー/ $30\mu\text{l}$ をRNA試料として用いた場合であり、NはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いた場合である。また、レーンMは分子量マーカーであり、1から15は実施例1で示したプライマー・プローブの組み合わせ番号である。

【図2】

図2は、実施例2で用いたインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドのインターカレーター性蛍光色素の化学構造である。 $B_1 \sim B_3$ は核酸塩基を示す。

【図3】

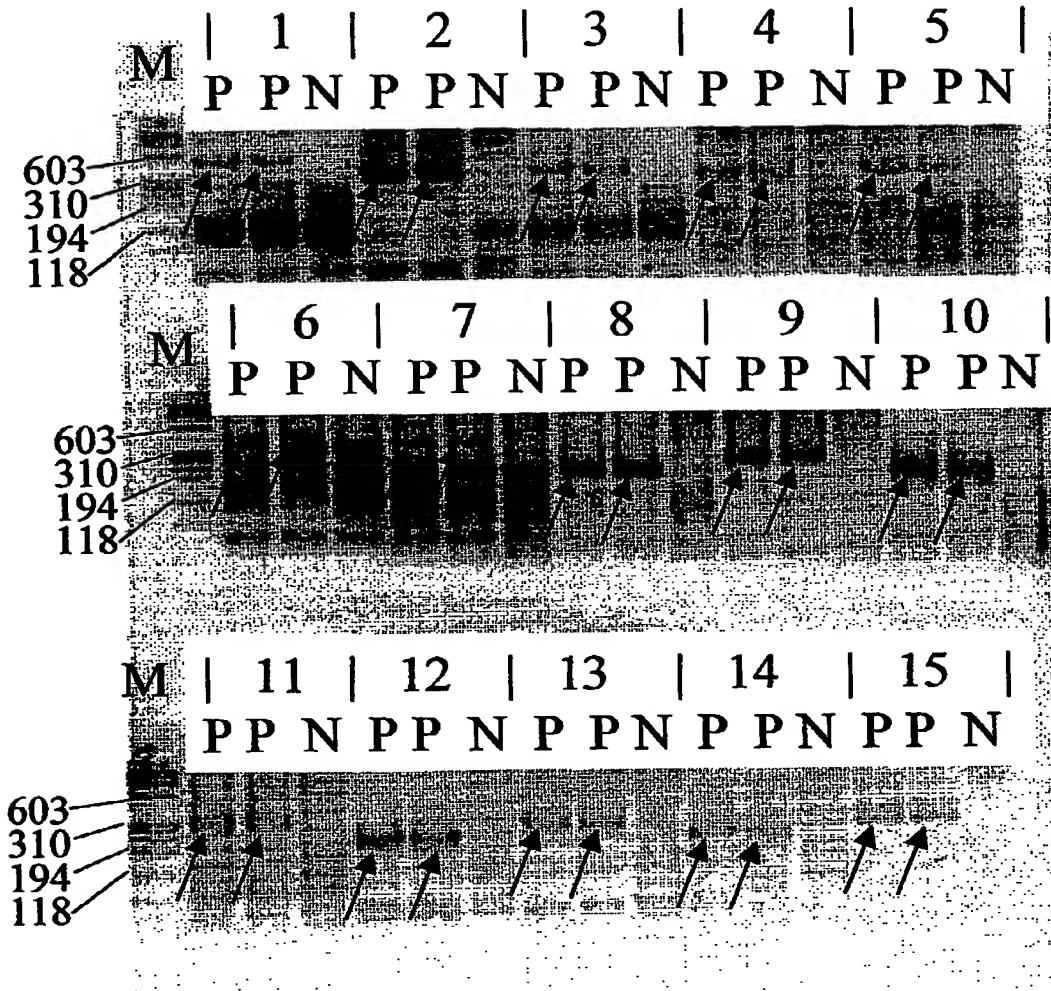
図3は、実施例2において、反応時間と蛍光増加率の時間を示したものである。1および2は実施例2で示したプライマー・プローブの組み合わせ番号である。図中、Pは組み合わせ1では初期RNA量 10^6 コピー/ $30\mu\text{l}$ をRNA試料として用いた場合であり、組み合わせ2では初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ をRNA試料として用いた場合である。NはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いた場合である。

【図4】

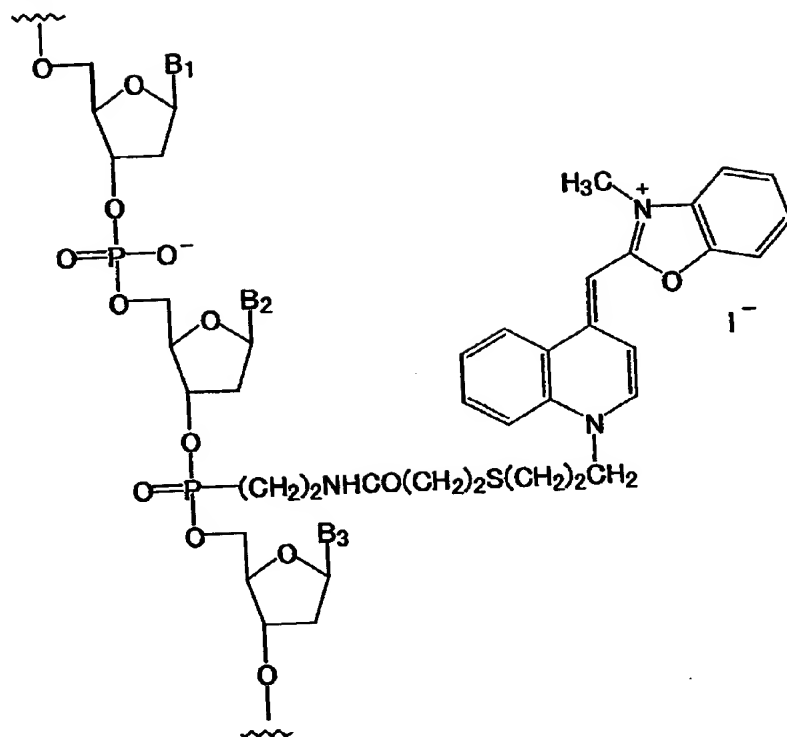
図4は、実施例3で行った初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ から10コピー/ $30\mu\text{l}$ において、反応時間とRNAの生成とともに増大する蛍光増加率のグラフである。N e g aはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いた。

【書類名】図面

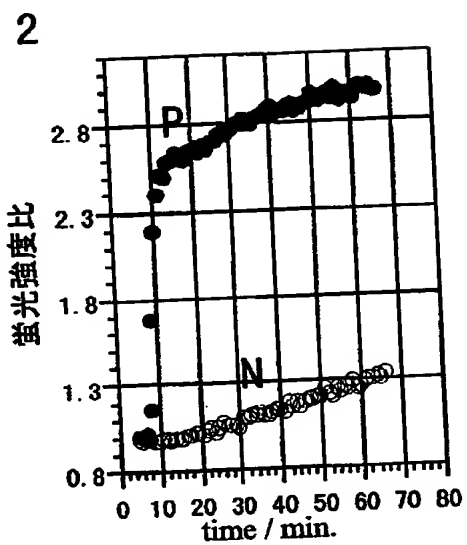
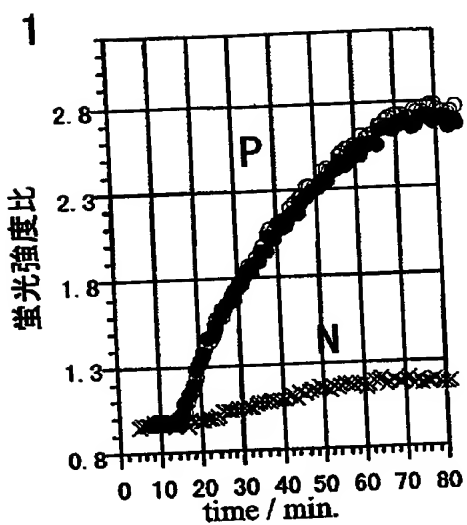
【図1】



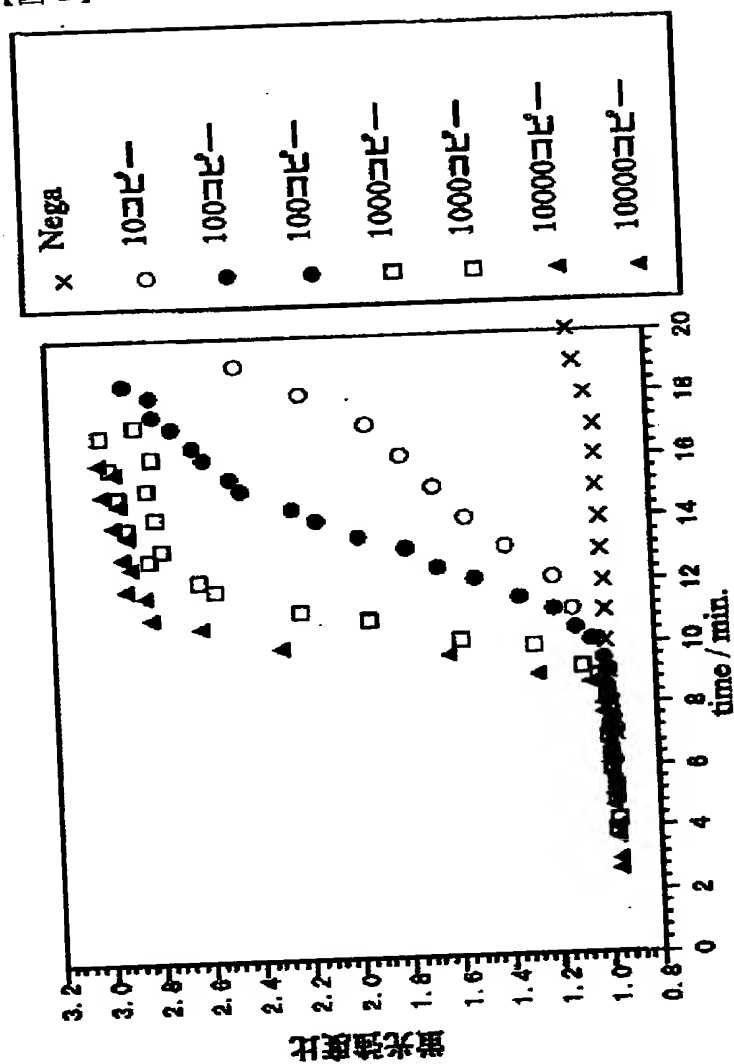
【図 2】



【図 3】



【図4】



【書類名】要約書

【課題】メシチリン耐性黄色ブドウ球菌の *mecA* 遺伝子に由来する RNA を特異的に増幅したり、検出及び同定を高感度で行うために有用なオリゴヌクレオチドの組み合わせを提供する。

【解決手段】RNA 増幅工程を利用した検出法において、第一のプライマーとして配列番号 1 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 2 から 4 のいずれかのオリゴヌクレオチドを用いるか、第一のプライマーとして配列番号 5 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 6 または 7 のオリゴヌクレオチドを用いるか、または第一のプライマーとして配列番号 8 のオリゴヌクレオチド、第二のプライマーとして配列番号 6 または 7 のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、検出法。

【選択図】図 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003300]

1. 変更年月日	1990年12月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	山口県新南陽市開成町4560番地
氏 名	東ソー株式会社